Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Über Stoffwechsel und Toxizität von Diuron beim Menschen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Friedemann Schüßler
aus
München

D 29

1971 M 348

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV. LEIDEN

Dekan: Professor Dr.Dr. Schiefer

Referent: Professor Dr.Dr. Geldmacher - v. Mallinckrodt

Coreferent: Professor Dr.Dr. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 1971

Arch. Toxikol. 27, 187—192 (1971)
© by Springer-Verlag 1971

Zu Stoffwechsel und Toxicität von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-3,3-dimethylharnstoff (Diuron) beim Menschen*

M. Geldmacher-v. Mallinckrodt und F. Schüssler
Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg

Eingegangen am 29. September 1970

Toxicity of Diuron 1-(3,4-dichlorophenyl)-3,3-dimethylurea and Its Metabolism in Man

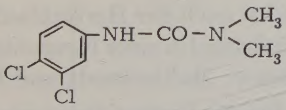
Abstract. After ingestion of 38mg/kg of Diuron concomitantly with 20 mg/kg aminotriazole, a 39 year old woman showed no signs of intoxication. From a urine specimen taken some hours later, 1-(3,4-dichlorophenyl)-3-methylurea and 1-(3,4-dichlorophenyl)-urea could be isolated and identificated. The urine specimen probably also contained some 3,4-dichloroaniline, but no unaltered Diuron was demonstrated.

Key-Words: Herbicides — Substituted Ureas-Diuron — 1-(3,4-dichlorphenyl-3,3-dimethylurea — Metabolism of Diuron in Man.

Zusammenfassung. Nach Einnahme von 38 mg/kg Diuron (zusammen mit 20 mg/kg Aminotriazol) traten bei einer 39jährigen Frau keine Intoxikationserscheinungen auf. In dem wenige Stunden nach der Aufnahme gelassenen Harn konnten (neben 100 mg/100 ml an unverändertem Aminotriazol) 1-(3,4-Dichlorphenyl)-3-methylharnstoff und 1-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff sowie wahrscheinlich auch 3,4-Dichloranilin als Diuron-Metaboliten gefunden werden. Unverändertes Diuron war nicht nachweisbar.

Schlüsselwörter: Herbizide — Harnstoffderivate, herbizide-Diuron — 1-(3,4-Dichlorphenyl)-3,3-dimethylharnstoff — Stoffwechsel von Diuron beim Menschen.

Diuron, 1-(3,4-Dichlorphenyl)-3,3-dimethylharnstoff



Diuron

gehört zu den substituierten Harnstoff-Herbiziden.

Es ist eine geruchlose weiße Substanz mit einem Schmelzpunkt von 158—159° C. Die Löslichkeit in Wasser von 25° C beträgt 42 ppm (Lowen u. Mitarb., 1964). In

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank aussprechen.

vielen organischen Lösungsmitteln ist es gut löslich. Die UV-Absorptionskurve weist in Boratpuffer pH 10, sowie im stark sauren und stark alkalischen Milieu gut ausgeprägte Maxima bei 247 nm auf.

Die ungefähre Letaldosis beträgt für männliche Ratten 5 g/kg, die LD_{50} (14 Tage) 3,4 g/kg; 1 g/kg täglich, über 14 Tage verabfolgt, führte zu Wachstumseinbuße und Veränderung der parenchymatösen Organe (Hodge u. Mitarb., 1967). Eine Gabe von 250 mg/kg oder zweimal 100mg/kg per os bewirkte bei Schafen Vergiftungserscheinungen, jedoch nicht den Tod (Palmer, 1964).

Diuron wird beim Verweilen im Boden (McCormick und Hiltbold, 1966) und auch im Stoffwechsel von Pflanze und Tier verändert. In Erdproben konnten Dalton u. Mitarb. (1966) neben unverändertem Diuron noch 1-(3,4-Dichlorphenyl)-3-methylharnstoff, 1-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff und 3,4-Dichloranilin finden.

In Pflanzen wiesen Smith und Sheets (1967) den Monomethylmetaboliten und das demethylierte Derivat nach, Onley u. Mitarb. (1968) außerdem 3,4-Dichloranilin und, u. U. als Artefakt, 3,4-Dichlornitrobenzol, Swanson und Swanson (1968) Diuron, das Monomethylderivat und die demethylierte Verbindung. Böhme und Ernst (1965) fanden in Rattenurin als Hauptmetaboliten 1-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff und 6-Hydroxy-3,4-dichlorphenylharnstoff, daneben wenig 3,4-Dichloranilin, 1-(3,4-Dichlorphenyl)-3-methylharnstoff und andere hydroxylierte Verbindungen. Die Hydroxyderivate waren zum größten Teil an Glucuron- und Schwefelsäure gebunden, und wurden vor der Analyse enzymatisch gespalten. Stoffwechseluntersuchungen an Hunden von Hodge u. Mitarb. (1967) ergaben als Hauptmetaboliten 1-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff, außerdem in geringer Menge 1-(3,4-Dichlorphenyl)-3-methyl-harnstoff, 3,4-Dichloranilin, 3,4-Dichlorphenol und wenig unverändertes Diuron. (Zusammenfassende Darstellung: Geissbühler, 1969).

Toxicität und Stoffwechsel beim Menschen wurden bisher nicht untersucht.

Wir konnten die Krankengeschichte einer 39jährigen Frau verfolgen, die nach ihren Angaben in suicidaler Absicht ein herbizidwirksames Präparat (Ustinex PA) aufgenommen hatte, das als Wirkstoffe 30% Aminotriazol (3-Amino-1,2,4-triazol) und 56% Diuron enthielt. Die aufgenommene Diuronmenge betrug etwa 38 mg/kg.

Bei der Krankenhausaufnahme zeigte sich keine auffällige Symptomatik; Vergiftungserscheinungen traten nicht auf. Im Harn waren weder Zucker noch Eiweiß nachweisbar; die Transaminasewerte lagen im Bereich der Norm.

In dem wenige Stunden nach der Herbizidaufnahme gelassenen Harn war unverändertes Aminotriazol in einer Konzentration von 100 mg/100 ml nachweisbar (Geldmacher-v. Mallinckrodt und H. P. Schmidt, 1970).

Um Anhaltspunkte für die Umwandlung von Diuron beim Menschen zu gewinnen, extrahierten wir einen Teil der Harnprobe der Patientin bei pH 7, pH 2 und pH 13 mit Äther; die mit wasserfreiem Natriumsulfat getrockneten Extrakte wurden nach Verjagen des Lösungsmittels in wenig Methanol gelöst, und dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel 254/366 (Woelm) mit Chloroform/Äthanol 9:1 nach Böhme und Ernst (1965) aufgetrennt.

Tabelle. *Prüfung auf Diuron und seine wichtigsten freien Metaboliten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung auf Kieselgel 254/366 (Woelm) mit Chloroform-Äthanol 90:10 nach Böhme und Ernst (1965)*

Verbindung	Auftrennung R_f-Wert in $CHCl_3/C_2H_5OH$ 90:10	Detektion				
		Betrachten unter der UV-Lampe	Ehrlich-Reagens		Diazotieren, Kuppeln	Phenol-reagens nach Katz und Nieh
			direkt	nach Erhitzen auf 150° C nach Henkel		
Diuron	0,70	Fl[a]	—	gelb	—	—
1-(3,4-Dichlorphenyl)-3-methylharnstoff	0,53	Fl	—	gelb	—	—
1-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff	0,26	Fl	gelb	gelb	—	—
3,4-Dichloranilin	0,75	Fl	gelb	gelb	orange	—
6-Hydroxy-3,4-dichlor-phenylharnstoff)[b]	0,24	Fl	gelb	gelb	—	(rot)
2-Hydroxy-3,4-dichlor-phenylharnstoff[b]	0,21	Fl	gelb	gelb	—	(rot)

[a] Fl = Fluorescenzlöschung bei 254 nm.
[b] Übernommen von Böhme und Ernst (1965).

Die Prüfung auf Diuron und seine wichtigsten Metaboliten erfolgte aufgrund der R_f-Werte sowie der Farbreaktionen mit verschiedenen Sprühreagentien, die in der Tabelle wiedergegeben sind.

Reagentien für die Detektion

1. Ehrlichs Reagens (freie NH_2-Gruppen): 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 6%iger HCl.

2. Diazotieren-Kuppeln (aromatische Amine): A. 1 Spatelspitze $NaNO_2$ in 10 ml 1n HCl (stets frisch herstellen). B. 1 Spatelspitze β-Naphthol in 10 ml 10%iger wäßriger Sodalösung.

Nacheinander mit A und B besprühen.

3. Reagens nach Katz und Nieh 1967 (Phenole):

a) Pufferlösung pH 8.

α) 0,5 n wäßrige NaOH;

β) 104,5 g K_2HPO_4 und 72,3 g KH_2PO_4 mit dest. Wasser auf 1 l lösen.

Gleiche Teile α und β werden gemischt.

b) Sprühlösung A.

0,5 g 4-Aminoantinpyrin in 100 ml Puffer pH 8

c) Sprühlösung B.

2,0 g $K_3Fe\ (CN)_6$ in 100 ml dest. Wasser.

Es wird zunächst mit A, dann mit B besprüht.

Damit konnten wir in keinem der Extrakte unverändertes Diuron nachweisen, ebensowenig nichtkonjugierte phenolische Metaboliten. Dagegen fand sich in allen Extrakten als Hauptmetabolit eine Fraktion mit den Eigenschaften von 1-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff, daneben 1-(3,4-Dichlorphenyl) 3-methylharnstoff. Die UV-Absorptionskurven dieser Fraktionen nach Elution aus der Sorptionsschicht wiesen in Boratpuffer pH 10 sowie im stark alkalischen und stark sauren Milieu die hierfür typischen Maxima bei 247 nm auf. In ganz geringer Menge war im alkalischen Extrakt eine Fraktion mit den Eigenschaften von 3,4-Dichloranilin zu finden.

Größere Anteile des sauren und neutralen Extraktes wurden sodann präparativ dünnschichtchromatographisch unter den bereits beschriebenen Bedingungen aufgetrennt, die beiden stärksten Fraktionen unter der UV-Lampe lokalisiert, abgekratzt und mit Äther eluiert. Sie konnten IR-spektrophotometrisch als 1-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff und 1-(3,4-Dichlorphenyl) 3-methylharnstoff identifiziert werden.

Auf konjugierte Metaboliten wurde aus Materialmangel nicht geprüft.

Nach dem Ergebnis unserer Untersuchungen beginnt der Abbau des Diuron beim Menschen ebenso wie bei Mikroorganismen oder in Pflanze und Tier grundsätzlich mit der aufeinanderfolgenden Abspaltung der ersten und zweiten Methylgruppe am Stickstoff und anschließender Hydrolyse. Das einfach und doppelt entmethylierte Derivat, sowie (wahrscheinlich auch) 3,4-Dichloranilin werden im menschlichen Urin

ausgeschieden. Für die Ausscheidung von unverändertem Diuron ergab sich kein Anhaltspunkt.

Die N-Demethylierung substituierter Harnstoffe erinnert an die N-Demethylierung alkylierter Amine, Amide und Carbamate. Derartige Reaktionen sind mit Säugetier-Lebermikrosomen durchgeführt worden. Sie erfordern Sauerstoff und NADPH (Geissbühler, 1969).

Die bisher aufgeklärten Stoffwechselwege des Diuron in Mikroorganismen, Pflanzen, Warmblütern und Mensch sind in Abb. 1 dargestellt.

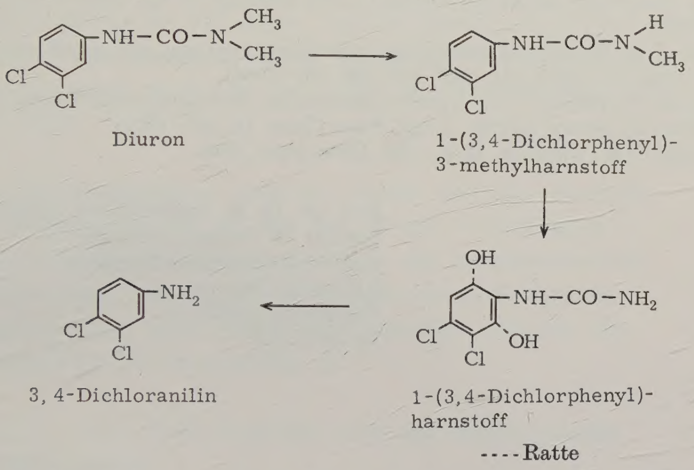


Abb. 1. Stoffwechsel von Diuron in Mikroorganismen, Pflanze, Warmblütern und Mensch. (Hydroxylierte Derivate mit Ausscheidung als Glucuronide oder Schwefelsäureester wurden bisher bei der Ratte nachgewiesen)

Herrn Dr. Lorke, Leiter des Institutes für Toxikologie der Farbenfabriken Bayer AG. Wuppertal-Elberfeld, danken wir für die Überlassung der reinen Vergleichssubstanzen.

Literatur

Böhme, C., Ernst, W.: Über den Stoffwechsel von Harnstoff-Herbiciden in der Ratte. 2. Mitt. Diuron und Afalon. Fd. Cosmet. Toxicol. **3**, 797 (1965).

Dalton, R. L., Evans, A. W., Rhodes, R. C.: Disappearance of diuron from cotton field soils. Weed **14**, 31 (1966).

Geissbühler, H.: The substituted ureas. In: Degradation of herbicides. Ed.: P. C. Kearney and D. D. Kaufman. New York: Marcel Dekker 1969.

Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., Schmidt, H. P.: Zu Toxizität und Stoffwechsel von Aminotriazol beim Menschen. Arch. Toxikol. **27**, 13—18 (1970).

Henkel, H. G.: Dünnschichtchromatographisches Verhalten herbizidwirksamer Verbindungen. 2. Mitt. Chimia **18**, 252 (1964).

Hodge, H. C., Downs, W. L., Panner, B. S., Smith, D. W., Maynard, E. A., Clayton, J. W., Rhodes, R. C.: Oral toxicity and metabolism of diuron (N-(3,4-dichlorophenyl)-N, N-dimethylurea) in rats and dogs. Fd. Cosmet. Toxicol. **5**, 513 (1967).

Katz, S. E., Nieh, M. T.: Thin layer chromatographic separation of linuron and diuron and some of their known or suspected soil metabolites. Bull. Environm. Cont. Toxicol. **2**, 75 (1967).

Lowen, W. K., Bleidner, W. E., Kirkland, J. J., Pease, H. L.: Monuron, Diuron and Neburon. In: Analytical methods for pesticides, plant growth regulators and food additives, vol. IV. Ed.: G. Zweig. New York and London: Academic Press 1964.

McCormick, L. L., Hiltbold, A. E.: Microbiological decomposition of Atrazine and Diuron in soil. Weed **14**, 77 (1966).

Onley, J. H., Yip, G., Aldridge, M. H.: A metabolic study of 3-(3,4-dichlorphenyl)-1,1-dimethylurea (diuron) applied to corn seedlings. J. Agr. Food Chem. **16**, 426 (1968).

Palmer, I. S.: Toxicity of methyluracil and substituted urea and phenol compounds to sheep. J. Amer. vet. med. Ass. **145**, 787 (1964).

Smith, J. W., Sheets, T. J.: Uptake, distribution, and metabolism of monuron and diuron by several plants. J. Agr. Food Chem. **15**, 577 (1967).

Swanson, C. R., Swanson, H. R.: Zit. Geissbühler 1969.

Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Institut für Rechtsmedizin der
Universität Erlangen-Nürnberg
BRD-8520 Erlangen
Universitätsstraße 22
Deutschland

Lebenslauf

Am 12. August 1945 wurde ich, Friedemann Schüßler, in München geboren. Seit 1947 bin ich in Erlangen wohnhaft.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Loschge - Volksschule in Erlangen. Anschließend wechselte ich in das Humanistische Gymnasium Fridericianum in Erlangen über, wo ich 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Friedrich - Alexander - Universität zu Erlangen. Nach dem Sommersemester 1965 legte ich dort die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, nach dem Wintersemester 1966/67 die Medizinische Vorprüfung ab.

Am 24. Juli 1970 beendete ich das Medizinische Staatsexamen.

Seit Oktober 1970 bin ich als Medizinalassistent in der Universitäts - Nervenklinik Erlangen tätig.

Erlangen, den 15.1.1971